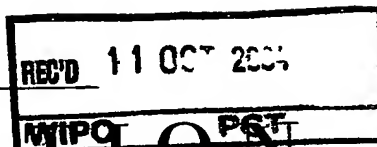


BEST AVAILABLE COPY

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

PCT / 1 B 0 4 / 2 9 3 6

11 OCT 2004

**BREVET D'INVENTION****CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION****COPIE OFFICIELLE**

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 17 AOUT 2004

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

**DOCUMENT DE PRIORITÉ**

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS  
CONFORMÉMENT À LA  
RÈGLE 17.1.a) OU b)

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS cedex 08  
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04  
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23  
[www.inpi.fr](http://www.inpi.fr)



26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

# BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354\*02

## REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

page 1/2



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 @ W / 010801

<b>REMISE DES PIÈCES</b> DATE <b>14 AOUT 2003</b> LIEU <b>INPI PARIS</b> N° D'ENREGISTREMENT <b>0309962</b> NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI <b>14 AOUT 2003</b>		<b>Reservé à l'INPI</b>	
<b>Vos références pour ce dossier</b> (facultatif) 33356/FR		<b>NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE</b>  <b>BREESE-MAJEROWICZ</b> 3, avenue de l'Opéra 75001 PARIS	
<b>Confirmation d'un dépôt par télécopie</b>		<input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie	
<b>2 NATURE DE LA DEMANDE</b>		<b>Cochez l'une des 4 cases suivantes</b>	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
Demande de brevet initiale		N° _____ Date _____	
ou demande de certificat d'utilité initiale		N° _____ Date _____	
Transformation d'une demande de brevet européen <i>Demande de brevet initiale</i>		<input type="checkbox"/> N° _____ Date _____	
<b>3 TITRE DE L'INVENTION</b> (200 caractères ou espaces maximum)			
COMPOSITION ANTI-BACTERIENNE, PLUS PARTICULIEREMENT CONTRE LES BACTERIES GRAM NEGATIF, COMPRENANT UN PEPTIDE ET UN AGENT ANTI-BACTERIEN AVANTAGEUSEMENT HYDROPHOBE			
<b>4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE</b>		Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ Pays ou organisation _____ N° _____ <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
<b>5 DEMANDEUR</b> (Cochez l'une des 2 cases)		<input checked="" type="checkbox"/> <b>Personne morale</b> <input type="checkbox"/> <b>Personne physique</b>	
Nom ou dénomination sociale		DIATOS	
Prénoms			
Forme juridique		Société Anonyme	
N° SIREN		4 2 1 7 2 6 7 3 8	
Code APE-NAF		7 3 1 Z	
Domicile ou siège	Rue	166 boulevard du Montparnasse	
	Code postal et ville	7 5 0 1 4 PARIS	
	Pays	France	
Nationalité		France	
N° de téléphone (facultatif)		N° de télécopie (facultatif)	
Adresse électronique (facultatif)			
<input type="checkbox"/> S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»			

Remplir impérativement la 2<sup>ème</sup> page

REMISE DES PIÈCES  
DATE **4 AOÛT 2003**  
LIEU **75 INPI PARIS**  
N° D'ENREGISTREMENT **0309962**  
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

DB 540 © W / 010801

<b>Vos références pour ce dossier :</b> (facultatif)		33356/FR
<b>6 MANDATAIRE (s'il y a lieu)</b>		
Nom		MAJEROWICZ
Prénom		Marc
Cabinet ou Société		BREESE-MAJEROWICZ
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel		
Adresse	Rue	3 avenue de l'Opéra
	Code postal et ville	7 5 0 0 1 Paris
	Pays	France
N° de téléphone (facultatif)		01 47 03 67 77
N° de télécopie (facultatif)		01 47 03 67 78
Adresse électronique (facultatif)		office@breesse.fr
<b>7 INVENTEUR (S)</b>		Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques
Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)
<b>8 RAPPORT DE RECHERCHE</b>		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Paiement échelonné de la redevance (en deux versements)		Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non
<b>9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</b>		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence) : AG [ ] [ ] [ ] [ ] [ ]
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes		
<b>10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire) MAJEROWICZ Marc 960703		<b>VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI</b> L. GUICHET

COMPOSITION ANTI-BACTERIENNE, PLUS PARTICULIEREMENT  
CONTRE LES BACTERIES GRAM NEGATIF, COMPRENANT UN PEPTIDE ET  
UN AGENT ANTI-BACTERIEN AVANTAGEUSEMENT HYDROPHOBE

5        La présente invention concerne le domaine des  
traitements anti-bactériens et plus particulièrement des  
méthodes et compositions pour traiter les infections par des  
bactéries gram négatif chez l'homme, l'animal ou les  
plantes.

10        Il a été décrit dans l'art antérieur des peptides  
capables de détruire les bactéries (Park CB, Kim HS, Kim SC.  
Biochem Biophys Res Commun. 1998 Mar 6;244(1):253-7). Il a  
également été rapporté dans la demande de brevet  
internationale PCT No. WO 01/64738 des peptides capables de  
15        réagir avec les aminoglycanes et de transporter dans des  
cellules eucaryotes ou procaryotes des molécules d'intérêt.

La quantité de molécules antibiotiques pénétrant dans  
la bactérie dépend de sa structure et de mécanismes  
impliqués dans le transport de substrats. Les bactéries Gram  
20        négatif se distinguent structurellement des bactéries Gram  
positif par la présence de deux membranes constituant  
l'enveloppe bactérienne. Si toutes les bactéries ont une  
membrane interne, les bactéries Gram négatif ont une  
membrane externe unique supplémentaire. Cette membrane  
25        externe hydrophobe constitue une barrière semi-perméable qui  
s'oppose à la pénétration des antibiotiques mais des  
porines, protéines formant des canaux, permettent l'entrée  
de petits solutés hydrophiles comme les éléments nutritifs  
et les antibiotiques de la famille des pénicillines et  
30        tétracyclines, mais excluent la pénétration de grosses  
molécules hydrophiles et les antibiotiques de la famille des  
macrolides/kétolides.

Une cause importante des échecs thérapeutiques contre  
les bactéries Gram négatif est l'émergence de souches

résistantes. Certaines résistances sont liées à une réduction de la perméabilité des membranes bactériennes (modifications quantitatives/qualitatives de porines). D'autres résistances tiennent à la présence d'une protéine  
5 membranaire qui provoque le rejet de l'antibiotique par un mécanisme d'efflux actif. Le développement de nouveaux types de molécules anti-bactériennes ou l'utilisation d'antibiotiques commerciaux non actifs sur les bactéries Gram négatif requiert leur entrée et leur délivrance au  
10 travers de membranes bactériennes sélectives.

La présente invention a précisément pour but d'offrir de nouvelles méthodes et compositions permettant de traiter efficacement les infections par les bactéries Gram négatif même lorsque celles-ci ont développé une résistance aux  
15 antibiotiques.

Ce but est atteint grâce à l'utilisation de peptides capables de traverser la membrane externe des bactéries Gram négatif et, via cette translocation de la membrane, de délivrer des molécules d'intérêt qui ne peuvent pas sinon  
20 pénétrer à l'intérieur des bactéries, du fait de leurs propriétés physico-chimiques.

Les travaux réalisés dans le cadre de la présente invention ont concerné le Bodipy et la Tétramethylrhodamine qui sont des molécules fluorescentes hydrophobes exclues par  
25 la membrane externe des bactéries Gram négatif. Ces traceurs fluorescents ont été choisis afin d'évaluer les propriétés d'internalisation des peptides de l'invention liés chimiquement à des molécules hydrophobes. La translocation des traceurs fluorescents dans la bactérie Gram négatif a  
30 été évaluée qualitativement sur *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*.

La présente invention a donc tout d'abord pour objet une composition anti-bactérienne, plus particulièrement

dirigée contre les bactéries Gram négatif, comprenant l'association :

a) d'au moins un peptide de 10 à 25 résidus d'acide aminé comprenant :

5 i) deux domaines chargés positivement à pH neutre constitués chacun de 3 à 9 résidus d'acide aminé dont les deux tiers au moins sont des acides aminés cationiques,

ii) entre lesdits domaines chargés positivement, un groupe de deux à trois résidus d'acide aminé non cationique,

10 iii) à l'une et ou l'autre des extrémités N ou C terminales du peptide, un groupe de 0 à 10 et de préférence de 0 à 5 résidus d'acide aminé choisis dans le groupe comprenant des acides aminés non hydrophobes et des acides aminés chargés positivement, mais dans le cas d'un résidu  
15 d'acide aminé chargé positivement celui-ci n'est pas directement adjacent aux domaines chargés positivement.

b) d'au moins un composé anti-bactérien.

Avantageusement, dans les peptides de l'invention ci-dessus, les acides aminés cationiques des deux domaines  
20 chargés positivement sont choisis dans le groupe comprenant l'arginine et la lysine.

On préfère dans les peptides de l'invention ci-dessus que les acides aminés non cationiques du groupe entre lesdits domaines chargés positivement soient des acides  
25 aminés non hydrophobes, choisis par exemple dans le groupe comprenant : l'acide glutamique, la serine, la glycine, la leucine, la glutamine.

L'orientation des séquences d'acide aminé selon  
30 l'invention est typiquement de N-terminale vers C-terminale. Cependant, selon un autre mode de réalisation, l'orientation peut être inversée, c'est-à-dire que les séquences d'acide aminés sont orientées de C-terminal vers N-terminal.

Des peptides préférés pour les compositions selon l'invention sont choisis dans le groupe comprenant les séquences suivantes (orientation N-terminal vers C-terminal) :

- 5           - DPV3 : Arg Lys Lys Arg Arg Arg Glu Ser Arg Lys Lys Arg Arg Arg Glu Ser (SEQ ID NO.1)
- DPV3.10 : Arg Lys Lys Arg Arg Arg Glu Ser Arg Arg Ala Arg Arg Ser Pro Arg His Leu (SEQ ID NO.2)
- DPV6 : Gly Arg Pro Arg Glu Ser Gly Lys Lys Arg Lys
- 10 Arg Lys Arg Leu Lys Pro (SEQ ID NO.3)
- DPV7 : Gly Lys Arg Lys Lys Lys Gly Lys Leu Gly Lys Lys Arg Asp Pro (SEQ ID NO.4)
- DPV7b : Gly Lys Arg Lys Lys Lys Gly Lys Leu Gly Lys Lys Arg Pro Arg Ser Arg (SEQ ID NO.5)
- 15           - DPV15 : Leu Arg Arg Glu Arg Gln Ser Arg Leu Arg Arg Glu Arg Gln Ser Arg (SEQ ID NO.6)
- DPV15b : Gly Ala Tyr Asp Leu Arg Arg Arg Glu Arg Gln Ser Arg Leu Arg Arg Arg Glu Arg Gln Ser Arg (SEQ ID NO.7)
- DPV1047 : Val Lys Arg Gly Leu Lys Leu Arg His Val
- 20 Arg Pro Arg Val Thr Arg Met Asp Val (SEQ ID NO.8)
- DPV11 : Ala Lys Thr Gly Lys Arg Lys Arg Ser Gly (SEQ ID NO.9)
- DPV1121 : Val Lys Arg Gly Leu Lys Leu Arg Gln Lys Tyr Asn Lys Arg Ala Met Asp Tyr (SEQ ID NO.11)
- 25           Parmi ceux-ci, l'invention concerne tout spécialement les peptides suivants : DPV3, DPV3.10, DPV6, DPV7, DPV7b, DPV15 et DPV15b.
- L'alignement des séquences ci-dessus met en évidence des domaines chargés positivement de séquences suivantes :
- 30           - Arg Lys Lys Arg Arg Arg (SEQ ID NO.13)
- Arg Pro Arg (SEQ ID NO.14)
- Lys Arg Lys Lys Lys Gly Lys (SEQ ID NO.15)
- Arg Arg Glu Arg (SEQ ID NO.16)
- Arg Arg Arg Glu Arg (SEQ ID NO.17)

- Arg Arg Ala Arg Arg Ser Pro Arg (SEQ ID NO.18)
- Lys Lys Arg Lys Arg Lys Arg Leu Lys (SEQ ID NO.19)
- Lys Lys Arg (SEQ ID NO.20)
- Lys Lys Arg Pro Arg Ser Arg (SEQ ID NO.21)
- Arg Leu Arg Arg Glu Arg (SEQ ID NO.22)
- Arg Leu Arg Arg Arg Glu Arg (SEQ ID NO.23)

De préférence, les domaines de séquences SEQ ID NO. 13 à 17 sont du côté de l'extrémité N terminale du peptide, alors que les domaines de séquences SEQ ID NO. 18 à 23 sont du côté de l'extrémité C terminale du peptide.

L'alignement des séquences ci-dessus a aussi mis en évidence des groupes de deux à trois résidus d'acide aminé non cationique entre les domaines chargés positivement de séquences suivantes :

Glu Ser, Glu Ser Gly, Leu Gly, Gln Ser

Les composés anti-bactériens présents dans les compositions selon l'invention sont de préférence choisis parmi ceux présentant des propriétés physico-chimiques les rendant incapables de traverser la membrane des bactéries Gram négatif. Tout préférentiellement, il s'agit de composés anti-bactériens hydrophobes. A titre d'exemples de tels composés, on peut citer les antibiotiques de la famille de macrolides, des ketolides comme l'erythromycine, la clarithromycine, l'azithromycine, la télithromycine.

Les composés anti-bactériens peuvent être aussi des oligonucléotides antisens.

L'évaluation des peptides DPV ci-dessus à montrer leur capacité à traverser les membranes des bactéries Gram négatif *E. coli* ou *P. aeruginosa* et de délivrer le Bodipy dans la bactérie, alors que celui-ci est une molécule hydrophobe normalement exclue par la membrane externe des bactéries Gram négatif qui représente une barrière semi-



perméable. De plus, il apparaît que ces peptides ont la capacité de traverser la membrane externe des deux souches de bactéries Gram négatif et de s'accumuler dans le cytoplasme bactérien par un mécanisme non énergie-dépendant et non toxique pour la bactérie.

Les travaux réalisés dans le cadre de l'invention, ont mis en évidence quelques différences d'internalisation entre les deux souches de bactéries *P. aeruginosa* et *E. coli*. Ainsi il semble que le peptide DPV7b soit plus internalisants dans *P. aeruginosa* que dans *E. coli*. Cette différence pourrait s'expliquer par des différences de structures de la membrane externe entre les deux souches de bactéries.

Ces peptides sont donc utiles pour la préparation de compositions pharmaceutiques anti-bactériennes, plus particulièrement contre les bactéries gram négatif, où ils sont associés à un ou plusieurs agents anti-bactériens.

Les compositions de l'invention sont utiles tant à titre préventif que curatif.

Les compositions selon l'invention comprennent également avantageusement un ou plusieurs véhicules, diluants ou excipients pharmaceutiquement acceptables généralement utilisés avec ce type d'agents.

Les peptides de l'invention peuvent être préparés par synthèse chimique ou par génie génétique dans une cellule procaryote comme une bactérie, dans une cellule eucaryote comme une levure, une cellule CHO, une cellule NSO, chez un animal transgénique, par exemple dans le lait de lapin, de chèvre, de brebis, de vache, etc... transgéniques ou dans une plante transgénique comme, par exemple, dans des plants de tabac, etc....

L'invention concerne aussi des équivalents fonctionnels des peptides définis ci-dessus, tels que des peptides comprenant des modifications issues de processus

post-traductionnels comme la glycosylation ou de modifications chimiques telles que le couplage avec des lipides, sucres, séquences de nucléotides dès lors que ces modifications ne modifient pas l'activité anti-bactérienne et/ou antifongique desdits peptides conformément aux tests donnés dans la partie expérimentale ci-après. Les équivalents fonctionnels comprennent aussi des peptides dont un ou plusieurs acides aminés sont des acides aminés de conformation D. L'invention couvre également les rétro-peptides et les rétro-inverso-peptides.

L'association des compositions selon l'invention peut être constituée d'un ou plusieurs peptides décrits ci-dessus et d'un ou plusieurs composés anti-bactériens, aussi sauf indication contraire, le singulier employé pour la définition des agents actifs (peptide et composé anti-bactérien) de la composition couvre le pluriel.

La composition selon l'invention peut être réalisée par l'association de peptide(s) et de composé(s) anti-bactérien(s) en mélange ou d'un produit dans lequel un ou plusieurs peptides identiques ou différents sont liées par covalence à un ou plusieurs composés identiques ou différents, éventuellement par l'intermédiaire d'un bras espaceur. De tels produits sont notamment des produits de formule (I) qui seront décrits ci-après.

Dans le cas de l'administration de peptide et de composé anti-bactérien en mélange, ces deux agents actifs de la composition anti-bactérienne de l'invention peuvent être présentés de façon séparée, chacun sous une forme pharmaceutique appropriée, et réunis dans un même emballage. Toutefois, pour faciliter l'administration simultanée des agents actifs, on préfère généralement préparer le médicament sous une seule forme pharmaceutique contenant les

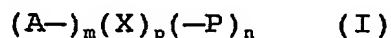
deux ingrédients actifs en mélange, ainsi éventuellement qu'un excipient pharmaceutique approprié.

Bien entendu, un produit constitué d'un peptide lié directement ou indirectement à un composé anti-bactérien  
 5 doit être considéré comme constituant à lui seul une association selon l'invention et qui peut être utilisé comme ingrédient actif unique.

Par exemple, un peptide et un composé anti-bactérien peuvent être combinés en établissant une liaison chimique  
 10 entre ceux-ci. On peut notamment amidifier une fonction amine du peptide, ou estérifier une ou plusieurs fonctions alcool du peptide, avec un groupement acide présent au niveau d'un composé anti-bactérien ou dérivé de celui-ci. On obtient ainsi un produit d'amidification qui constitue le  
 15 produit actif de la composition de l'invention. On peut également ajouter à l'une et/ou l'autre des extrémités N et/ou C terminal du peptide un résidu d'acide aminé dont la chaîne latérale permet le couplage avec un composé anti-bactérien, comme par exemple un résidu de cystéine dont le  
 20 groupe SH est réactif. Des exemples de tels produits sont ceux de formule (I) qui sont décrits ci-dessous.

En effet, l'invention a également pour objet de nouveaux produits où le peptide et le composé anti-bactérien sont liés l'un à l'autre par covalence, éventuellement par  
 25 l'intermédiaire d'au moins un bras espaceur.

De tels produits sont notamment ceux qui répondent à la formule (I) suivante :



dans laquelle : A est le reste d'un composé anti-bactérien, P est le reste d'une peptide, tels que définis  
 30 précédemment, et X représente soit une liaison covalente entre A et P, soit un bras espaceur reliant au moins un reste A à au moins un reste P, m est un nombre entier pouvant aller de 1 à 3, n est un nombre entier pouvant aller

de 1 à 3, et  $p$  représente zéro ou un nombre entier au plus égal au plus grand des nombres  $m$  et  $n$ .

On peut en effet, soit greffer un ou plusieurs restes A et/ou P sur un seul bras espaceur, soit greffer un ou plusieurs groupes A-X sur un reste P (et alors  $m = p$  et  $n = 1$ ), soit greffer un ou plusieurs groupes X-P sur un reste A (et alors  $n = p$  et  $m = 1$ ). Lorsque  $p = \text{zéro}$ , soit un ou plusieurs restes A sont liés directement à un reste P (et  $n = 1$ ), soit un ou plusieurs restes P sont liés directement à un reste A (et  $m = 1$ ).

Les produits de formule (I) peuvent être utilisés sous forme de sels, en particulier sous forme de sels de métaux alcalins tels que des sels de sodium ou de potassium ; ces sels sont par exemple ceux des groupements phosphates, s'ils sont présents, des groupements phénoliques (cas de l'acide salicylique), etc. On peut également utiliser les produits de formule (III), le cas échéant, sous forme de sels d'addition (par exemple sous forme de chlorhydrate) lorsque ces produits contiennent un groupement amine.

Les liaisons entre le bras espaceur et les restes A et P ou directement entre A et P sont des liaisons covalentes. Ces liaisons covalentes peuvent être formées, comme indiqué précédemment, entre des groupes ester carboxylique, amide carboxylique, ester thiocarboxylique ou amide thiocarboxylique.

Les restes de composé anti-bactérien (A) et de peptide (P) sont des dérivés de composé anti-bactérien ou de peptide, dont un ou plusieurs groupes chimiques ont été soit supprimés soit modifiés de façon à permettre la formation de liaison covalentes directement entre A et P ou indirectement par l'intermédiaire d'un bras espaceur.

Il peut s'agir de fonctions acyles de composés anti-bactériens possédant un groupe carboxylique capable de former une liaison avec le bras espaceur ou le peptide, ce

dernier possédant une amine primaire ou un groupe hydroxyle apte à former une liaison covalente avec le bras espaceur ou le corticoïde

Les bras espaceurs peuvent être notamment des restes  
 5 bivalents de composés aliphatiques bi-fonctionnels, comme des composés ayant à chacune de leurs extrémités des groupes fonctionnels réactifs permettant chacun de former des liaisons covalentes avec A et avec P. Ces composés peuvent être par exemple des composés qui possèdent à la fois un  
 10 groupe amino et un groupe carboxylique (ou thiocarboxylique), ou encore des composés qui possèdent à la fois un groupe amino et un groupe hydroxyle.

Dans la formule (I), le groupe X (en faisant abstraction de ses groupes fonctionnels d'extrémité)  
 15 représente notamment un groupe aliphatique divalent éventuellement interrompu par un ou plusieurs hétéroatomes - O - ou - S - ou par un ou plusieurs groupements hétéroatomiques - NH - ou - CO - NH -.

Les composés capables de donner, après réaction avec  
 20 le peptide et le composé anti-bactérien ou leurs dérivés, des produits de formule (I) dans lesquels A et P sont reliés par des bras espaceurs, sont par exemple des acides alpha-, bêta- ou gamma-amino alcanecarboxyliques, en particulier des acides alpha - aminés naturels tels que la glycine,  
 25 l'alanine, la valine ou la leucine, ou encore des peptides, notamment des dipeptides ou des tripeptides. Comme indiqué dans les exemples, il peut s'agir avantageusement d'un résidu de cystéine.

Les agents espaceurs peuvent également être des acides  
 30 hydroxy-carboxyliques tels que les acides lactique, glycolique, les acides aldoniques (gluconique, mannique, galactonique, ribonique, arabinonique, xylonique et érythronique) et les lactones ou dilactones correspondantes

(par exemple lactide, glycolide, delta-glucolonactone, delta-valéronactone), ou encore les acides aldariques.

Les groupes fonctionnels éventuellement présents sur le bras espaceur et non impliqués dans la liaison avec A ou P peuvent être utilisés pour greffer d'autres restes A et/ou P de façon à obtenir des composés de formule (III) pour lesquels m et/ou n sont supérieurs à 1. C'est le cas par exemple des groupes hydroxyles des hydroxyacides, du second groupe carboxylique des acides aminés diacides carboxyliques, du second groupe amino des aminoacides diamminés, du groupe hydroxyle des acides aminés hydroxylés, etc.

Le bras espaceur peut avantageusement constitué une molécule de liaison apte à permettre la libération retardée de l'un et/ou l'autre des restes A ou P, notamment en les protégeant d'une dégradation après administration. Le bras espaceur peut aussi constitué une molécule de vectorisation permettant de cibler un organe ou tissu particulier pour la délivrance des restes de purine ou de corticoïde,

Pour préparer les composés de formule (III), on utilise les méthodes classiques de la synthèse organique. Par exemple, pour préparer des amides ou des esters, on peut faire réagir un composé carboxylique sous la forme d'un halogénure d'acide carboxylique (ou thiocarboxylique), ou sous la forme d'un anhydride mixte, ou sous la forme d'un ester activé, par exemple un ester de p-nitrophényle. On peut également activer l'acide à l'aide d'un agent de couplage tel que le dicyclohexylcarbodiimide.

Comme les composés de formule (I) comprennent des restes de peptide, on peut les préparer en utilisant en particulier les méthodes connues dans la chimie des peptides.

Bien entendu, lorsque les composés dont dérivent A, P ou X de la formule (I), comprennent plusieurs fonctions

susceptibles de réagir, il convient d'opérer soit en utilisant les réactifs en proportions stoechiométriques (selon le nombre de produits précurseurs de A et/ou de P que l'on veut faire réagir), soit en protégeant temporairement

5 les fonctions réactives dont on ne souhaite pas qu'elles réagissent. On utilise pour cela les méthodes de protection temporaire desdites fonctions réactives. Ces méthodes de protection temporaire sont bien connues, notamment celles qui ont été développées lors des recherches concernant la

10 synthèse des peptides. Par exemple, les groupements  $-NH_2$  peuvent être protégés par des groupements carbobenzoxy, phtaloyle, t-butoxycarbonyle, trifluoroacétyle, toluènesulfonyle ; les groupements carboxyliques peuvent être protégés sous la forme d'esters benzyliques, d'esters

15 de tétrahydropyranyle ou d'esters de t-butyle ; les alcools peuvent être protégés sous la forme d'esters (par exemple acétates), sous la forme d'éthers de tétrahydropyranyle, d'éthers benzyliques ou d'éthers de trityle, ou encore sous la forme d'acétals (y compris sous la forme d'acétonides

20 dans le cas des glycols vicinaux). Les réactions de protection et de déprotection éventuelle de divers groupes chimiques sont connues et décrites dans la littérature.

Les réactions de phosphatation ou de déphosphatation de l'alcool primaire des nucléotides ou nucléosides peuvent

25 être mises en œuvre en utilisant les enzymes naturelles (par exemple phosphatases, phosphokinases).

Les compositions anti-bactériennes de l'invention, et

~~notamment celles comprenant un composé de formule (I),~~

30 peuvent être administrées par l'un quelconque des modes d'administration acceptés pour les agents thérapeutiques et bien entendu par voie orale, sublinguale, nasale, pulmonaire, rectale ou parentérale (par exemple intravasculaire, intramusculaire, transcutanée, intra-

articulaire). On peut aussi citer l'administration systémique, topique ou encore centrale, par exemple par voie chirurgicale intracrânienne ou encore l'administration intra-oculaire. On peut citer aussi l'implantation sous-cutanée d'implants biodégradable.

A cet effet, elles peuvent être présentées sous toute forme permettant l'administration par :

- voie orale (en particulier sous la forme de gélules, de solutions ou émulsions buvables, de poudres, de gels, de granulés, de tablettes ou de comprimés), de comprimés, gélules, capsules molles, y compris les formulations à libération différée ou prolongée, pilules, poudres, granules, élixirs, teintures, suspensions, sirops et émulsions. Cette forme de présentation est plus particulièrement adaptée au passage de la barrière intestinale et à l'utilisation la plus commune des composés anti-bactériens et/ou antifongiques.

- voie parentérale, généralement par injection intramusculaire ou intraveineuse par perfusion. Les compositions injectables peuvent être préparées sous des formes classiques, soit en suspension ou solution liquide soit sous forme solide convenant à une dissolution extemporanée dans un liquide adéquat, y compris les formulations à libération différée ou prolongée comme l'inclusion des peptides dans des micro ou nano particules biodégradables de formulation lipidique ou de formulation de dextran ou encore de PLGA ou équivalents. Cette forme de présentation est plus particulièrement adaptée au passage de la barrière hémato-encéphalique et à l'utilisation hospitalière des composés anti-bactériens et/ou antifongiques.

Une possibilité pour l'administration parentérale utilise l'implantation d'un système à libération lente ou



libération prolongée qui assure le maintien d'un niveau constant de dose.

Une autre possibilité consiste à fixer par adsorption ou autre les peptides de l'invention sur un support, comme  
5 un cathéter, une prothèse ou une colle biologique.

- voie nasale (par exemple des solutions à administrer sous forme de gouttes ou de pulvérisations),

- voie pulmonaire (solutions en flacon pressurisé pour aérosols),

10 - voie rectale (suppositoires),

- voie cutanée (par exemple crèmes, onguents ou dispositifs transdermiques, encore appelés timbres ou patches),

- voie transmuqueuse comme par exemple par voie  
15 sublinguale (solutions en flacon pressurisé, ou comprimés à délitement buccal).

Ces formes pharmaceutiques sont préparées de façon usuelle et peuvent contenir des excipients et véhicules classiques appropriés.

20

D'autres préparations topiques habituelles comprennent les crèmes, les onguents, les lotions, les gels et les sprays aérosols. Ces derniers sont plus particulièrement adaptés pour le traitement des infections broncho-  
25 pulmonaires bactériennes et/ou fongiques.

Les compositions de l'invention peuvent aussi être utilisées dans le domaine cosmétique, à titre essentiellement préventif, et consistant alors en crèmes, ~~verniss à ongle, produits d'hygiène des organes génitaux,~~  
30 pâtes de dentifrices, solutions d'hygiène buccales ou à inclure dans des micro-particules à diffusion lente, en phase aqueuse, incluses par exemple dans des couches-culottes, des cotons-tiges, des pansements, des cotons à

démaquiller, des serviettes hygiéniques ou encore des litières pour animaux.

En fonction du mode d'administration, les composés peuvent être sous forme solide, semi-solide ou liquide.

5 Pour les compositions solides, tels que comprimés, pilules, poudres ou granulés à l'état libre ou inclus dans des gélules, l'association peut être combinée avec :

10 - des diluants, par exemple le lactose, le dextrose, le sucrose, le mannitol, le sorbitol, la cellulose et/ou la glycine ;

- des lubrifiants, par exemple la silice, le talc, l'acide stéarique, son sel de magnésium ou de calcium et/ou le polyéthylèneglycol ;

15 - des liants, par exemple le silicate de magnésium et d'aluminium, la pâte d'amidon, la gélatine, la gomme adragante, la méthylcellulose, la carboxyméthylcellulose sodique et/ou la poly-vinylpyrrolidone ; le cas échéant,

20 - des désintégrants, par exemple l'amidon, l'agar, l'acide alginique ou son sel de sodium, ou des mélanges effervescents ; et/ou

- des absorbants, colorants, aromatisants et édulcorants. Les excipients peuvent être par exemple du mannitol, lactose, amidon, stéarate de magnésium, saccharine sodique, talc, cellulose, glucose, sucrose, carbonate de 25 magnésium et analogues de qualité pharmaceutique.

Pour les compositions semi-solides, telles que suppositoires, l'excipient peut, par exemple, être une émulsion ou suspension grasse, ou à base de polyalkylèneglycol, tel que le polypropylène-glycol.

30 Les compositions liquides, en particulier injectables ou à inclure dans une capsule molle, peuvent être préparées par exemple par dissolution, dispersion, etc. du principe actif dans un solvant pharmaceutiquement pur tel que, par

exemple, l'eau, le sérum physiologique, le dextrose aqueux, le glycérol, l'éthanol, une huile et analogues.

Les compositions selon l'invention peuvent également être administrés sous la forme de systèmes de libération du type liposomes, tels que sous la forme de petites vésicules unilamellaires, de grandes vésicules unilamellaires et de vésicules multilamellaires. Les liposomes peuvent être formés à partir d'une diversité de phospholipides, contenant du cholestérol, de la stéarylamine ou des phosphatidylcholines. Dans une forme d'exécution, un film de composants liquides peut être hydraté avec une solution aqueuse du médicament pour former une couche lipidique encapsulant le médicament.

Les compositions selon l'invention peuvent être stérilisées et/ou contenir des adjuvants et substances auxiliaires non toxiques tels que des agents de conservation, de stabilisation, de mouillage ou d'émulsification, des agents favorisant la dissolution, des sels pour régler la pression osmotique et/ou des tampons. En outre, elles peuvent également contenir d'autres substances présentant un intérêt thérapeutique. Les compositions sont préparées, respectivement, par des procédés classiques de mélange, granulation ou enrobage et elles contiennent d'environ 0,1 à 75%, de préférence d'environ 1 à 50 %, de principe actif.

Les peptides et agents anti-bactériens de l'association de la composition selon l'invention peuvent être également couplés avec des polymères solubles tels que ~~des supports de médicament ciblables. De tels polymères~~ peuvent comprendre la polyvinylpyrrolidone, le copolymère pyrane, le polyhydroxypropyl-méthacrylamide-phénol, le polyhydroxy-éthyl-aspanamide-phénol ou le poly(oxyde d'éthylène)-polylysine substitué par des résidus palmitoyle, le dextran. En outre, les composés selon la présente

invention peuvent être couplés à une classe de polymères biodégradables utiles pour réaliser une libération maîtrisée d'un médicament, par exemple, le poly(acide lactique), la poly(epsilon-caprolactone), le poly(acide hydroxybutyrique),  
5 les polyorthoesters, les polyacétals, les polydihydropyranes, les polycyanoacrylates et les copolymères d'hydrogel séquencés réticulés ou amphipatiques.

La posologie pour l'administration des compositions selon l'invention est choisie en fonction de nombreux  
10 facteurs y compris le type, l'espèce, l'âge, le poids, le sexe et l'état médical du sujet, la gravité de l'état à traiter, la voie d'administration ; l'état des fonctions rénale et hépatique du sujet et la nature du composé particulier, ou sel, employé. Un médecin ou vétérinaire  
15 normalement expérimenté déterminera facilement, et prescrira, la quantité efficace pour prévenir, contrarier ou stopper le progrès de l'état médical à traiter.

Une composition selon l'invention peut contenir de 0,1 à 99%, de préférence 1 à 70% de principe actif.

20 A titre d'exemples, les posologies orales des compositions selon l'invention seront comprises entre environ 0,5 et 1 mg/jour par voie orale et, de préférence fournies sous la forme de comprimés contenant 0,5, 1, 2,5, 5, 10, 15, 25, 50, 100, 250, 500 et 1.000 mg de principe  
25 actif. Les concentrations plasmatiques efficaces seront obtenues à partir d'une posologie allant de 0,002 mg à 50 mg par kg de poids corporel et par jour.

Les compositions de l'invention peuvent être administrés sous la forme de doses quotidiennes uniques, ou  
30 en deux, trois ou quatre doses par jour.

D'autres avantages et caractéristiques de l'invention apparaîtront des exemples qui suivent, donnés à titre

illustratif, et dans lesquels il sera fait référence aux dessins en annexe où :

La figure 1 représente la formule du Bodipy® FL N-(2-aminoethyl) maléimide.

5 La figure 2 représente la formule du Tetramethylrhodamine-6-maléimide.

La figure 3 représente l'internalisation des conjugués DPV-Bodipy dans *E. coli*.

10 La figure 4 représente l'immuno-marquage de la membrane externe après internalisation du conjugué DPV3-bodipy.

La figure 5 représente l'internalisation des conjugués DPV-Bodipy dans *P. aeruginosa*.

15 La figure 6 donne des images de microscopie confocal de *P. aeruginosa*.

La figure 7 représente l'internalisation du conjugué DPV3-TMR dans *E. coli*.

## I - Matériels et Méthodes.

### 20 I.1) Traceurs fluorescents.

- Le Bodipy® FLN-(2-aminoethyl) maleimide (Bodipy) (Molecular Probes Cat# B-10250), dont la formule moléculaire est  $C_{20}H_{21}BF_2N_4O_3$ , Le poids moléculaire est de 414,22, l'absorbance de 504nm et l'émission de 510nm (fluorescence verte), et la formule développée est donnée à la figure 1.

- Tetramethylrhodamine-6-maleimide (TMR) (Molecular Probes Cat# T-6028), dont la formule moléculaire est  ~~$C_{28}H_{23}N_3O_5$~~ , ~~le poids moléculaire est de 481,51,~~ l'absorbance de 541nm et l'émission 567nm (fluorescence rouge) et la formule développée est donnée à la figure 2.

30 Ces deux molécules fluorescentes contiennent un groupe réactif maléimide permettant le couplage chimique sur la fonction thiol de la cystéine du peptide.

## I.2) Les vecteurs peptidiques (DPVs).

Les peptides de séquences ci-dessous ont été utilisés :

- DPV3 : Arg Lys Lys Arg Arg Arg Glu Ser Arg Lys Lys  
5 Arg Arg Arg Glu Ser (SEQ ID NO.1) avec un résidu Cys à son  
extrémité C terminale,

- DPV3.10 : Arg Lys Lys Arg Arg Arg Glu Ser Arg Arg  
Ala Arg Arg Ser Pro Arg His Leu (SEQ ID NO.2) avec un résidu  
Cys à son extrémité C terminale,

10 - DPV6 : Gly Arg Pro Arg Glu Ser Gly Lys Lys Arg Lys  
Arg Lys Arg Leu Lys Pro (SEQ ID NO.3) avec un résidu Cys à  
son extrémité C terminale,

- DPV7 : Gly Lys Arg Lys Lys Lys Gly Lys Leu Gly Lys  
Lys Arg Asp Pro (SEQ ID NO.4) avec un résidu Cys à son  
15 extrémité C terminale,

- DPV7b : Gly Lys Arg Lys Lys Lys Gly Lys Leu Gly Lys  
Lys Arg Pro Arg Ser Arg (SEQ ID NO.5) avec un résidu Cys à  
son extrémité C terminale,

- DPV15 : Leu Arg Arg Glu Arg Gln Ser Arg Leu Arg Arg  
20 Glu Arg Gln Ser Arg (SEQ ID NO.6) avec un résidu Cys à son  
extrémité C terminale,

- DPV15b : Gly Ala Tyr Asp Leu Arg Arg Arg Glu Arg Gln  
Ser Arg Leu Arg Arg Arg Glu Arg Gln Ser Arg (SEQ ID NO.7)  
avec un résidu Cys à son extrémité N terminale,

25 - DPV1047 : Val Lys Arg Gly Leu Lys Leu Arg His Val  
Arg Pro Arg Val Thr Arg Met Asp Val (SEQ ID NO.8) avec un  
résidu Cys à son extrémité N terminale,

- DPV11 : Ala Lys Thr Gly Lys Arg Lys Arg Ser Gly (SEQ  
ID NO.9) avec un résidu Cys à son extrémité C terminale,

30 - DPV12 : Gln Gly Lys Ser Lys Arg Glu Lys Lys Asp Arg  
Val Phe (SEQ ID NO.10) avec un résidu Cys à son extrémité C  
terminale,

- DPV1121 : Val Lys Arg Gly Leu Lys Leu Arg Gln Lys Tyr Asn Lys Arg Ala Met Asp Tyr (SEQ ID NO.11) avec un résidu Cys à son extrémité N terminale,

- DPV19 : Asn Pro Gly Val Ser Thr Val Val Leu Gly Ala Tyr Asp Leu Arg Arg Arg Glu Arg Gln Ser Arg (SEQ ID NO.12) avec un résidu Cys à son extrémité N terminale.

Les synthèses peptidiques ont été réalisées selon les techniques connues de l'homme de métier. Les peptides sont solubles dans l'eau.

10 Les peptides possèdent un résidu Cystéine en position N- ou C- terminale afin de permettre la conjugaison au traceur fluorescent.

#### I.3) Les produits contrôles.

Bodipy et TMR sont couplés chimiquement à un résidu cystéine et servent de témoin négatif d'internalisation.

#### I.4) Méthode de couplage chimique.

Les solutions de Bodipy ou TMR sont préparées à une concentration finale de 50mM en Diméthylformamide (DMF). Les solutions de DPVs sont préparées à une concentration finale de 10mM en DMF. 200 µl de la solution de Bodipy ou TMR sont mélangés à 700 µl de la solution de DPV. Après une incubation de 2 heures à température ambiante, à l'obscurité, 2ml d'H<sub>2</sub>O et 8ml de dichlorométhane (DCM) sont ajoutés. La solution est mélangée au vortex et centrifugée 2 minutes à 3000g. La phase aqueuse est prélevée et conservée. Quatre extractions successives au DCM sont réalisées. Les phases aqueuses sont rassemblées dans un flacon de verre et placées 1 heure à -80°C avant d'être lyophilisées au minimum 18 heures. La poudre obtenue est stockée sous argon à -20°C à l'abri de la lumière.

#### I.5) Conservation des conjugués en solution.

Les conjugués DPV-Bodipy et DPV-TMR sont conservés dilués à 3mM dans H<sub>2</sub>O à -20°C, à l'abri de la lumière.

#### I.6) Analyse HPLC des conjugués.

- Pour les conjugués Bodipy :

Colonne Luna 100Å 3µ C18 100x4.6 mm

Solvant A: 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O

Solvant B: 0.1% TFA in CAN

5 Gradient: 5% B \_ 60% en 10 min, 60 \_ 90% en 1 min, 90% B en 3 min

Flux: 1.2 ml/min; volume injecté: 10 µl; la concentration de l'échantillon injecté est de 1 mg/ml en 0.1% TFA

10 Détecteur: DAD: 214nm, 300 nm..

- Pour les conjugués TMR :

Colonne Luna 100Å 3µ C18 100x4.6 mm

Solvant A : 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O

Solvant B : 0.1% TFA in CAN

15 Gradient : 5% B \_ 60% en 10 min, 60 \_ 90% en 1 min, 90% B en 3 min

Flux : 1.2 ml/min; volume injecté: 20 µl; la concentration de l'échantillon injecté est de 1 mg/ml en 0.1% TFA

20 Détecteur: DAD: 220 nm.

I.7) Souches bactériennes.

- *Escherichia coli* ATCC 25922

- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

I.8) Protocole d'internalisation.

25 I.8.a) Evaluation de la pénétration des conjugués dans la bactérie à 37°C.

30 Les bactéries en phase exponentielle de culture sont centrifugées et lavées 3 fois avec le tampon phosphate de sodium 10mM, pH7.4 (tampon NAPB). La concentration bactérienne est ajustée à 1x10<sup>6</sup> ufc/ml (Unités Formant Colonies) dans le tampon NAPB. 50 µl de la suspension bactérienne sont déposés sur lame de poly-L-Lysine . Après une incubation de 30 minutes à 37°C en chambre humide, les bactéries immobilisées sur la lame sont rincées 3 fois avec



le tampon NAPB. 50  $\mu$ l de solution de conjugué DPV-Bodipy ou DPV-TMR ou produit contrôle sont déposés sur les bactéries. Après une incubation de 30 minutes à 37°C en chambre humide et à l'abri de la lumière, les lames sont rincées 3 fois avec le tampon NAPB. Les bactéries peuvent être fixées sur la lame par une incubation de 20 minutes à 37°C à l'abri de la lumière. Une goutte de PBS/Glycérol 50% est déposée sur la lame et recouverte d'une lamelle de verre. Après scellage de la lamelle sur la lame, la fluorescence des bactéries est observée sous microscope optique à épifluorescence Leica (objectif 40X ou 63X à immersion). Les images sont prises avec la caméra numérique Nikon coolpix au zoom maximal et avec l'adaptateur 0.63 X. Une analyse plus détaillée est réalisée au microscope confocal Bio-rad MRC 600 (BIO-RAD Microscience Ltd., Hemel Hempstead, England), équipé d'un microscope optique inversé et d'un objectif à immersion X100. Les bactéries sont visualisées par leur fluorescence après excitation par un laser Krypton/Argon. Plusieurs coupes de bactéries de 0.1 - 0.2  $\mu$ m sont réalisées.

#### 20 I.8.b) Evaluation de la pénétration des conjugués dans la bactérie à +4°C.

La méthode décrite précédemment (I.8.a) a été modifiée comme suit. Les bactéries immobilisées sur lame de poly-L-Lysine et rincées 3 fois avec le tampon NAPB sont incubées pendant 24 heures à +4°C avant l'addition des conjugués DPV fluorescents pré-incubés à +4°C. Toutes les étapes suivantes sont réalisées à +4°C avec des solutions froides.

#### I.9) Immuno-marquage de la membrane externe des bactéries : immunofluorescence indirecte.

30 Les bactéries immobilisées sur lame de poly-L-Lysine sont rincées 3 fois avec du tampon NAPB et incubées 30 minutes à température du laboratoire avec une solution NAPB/SAB 0.05% (Sérum albumine bovine). Les bactéries sont incubées 30 min à la température du laboratoire avec

l'anticorps monoclonal de souris anti-endotoxine (Biovalley Cat# C55157; batch# 212529) dilué dans NAPB/SAB 0.05% , lavées plusieurs fois avec NAPB/SAB 0.05% puis incubées 30 minutes à la température du laboratoire, à l'abri de la lumière, avec un deuxième anticorps : anticorps polyclonal de lapin anti-souris conjugué à la tétraméthyl rhodamine (TRITC) (Jackson ImmunoResearch Cat# 315-026-003, batch# 47511) ou à la fluorescéine (FITC) ((Jackson ImmunoResearch Cat# 715-095-150, batch# 51038). Après plusieurs lavages avec le tampon NAPB, une goutte de PBS/Glycérol 50% est déposée sur la lame et recouverte d'une lamelle de verre. Après scellage de la lamelle sur la lame, la fluorescence des bactéries est observée au microscope confocal comme il est décrit précédemment (§ III.8.a).

#### 15 I.10) Evaluation de l'activité anti-bactérienne des conjugués.

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) sont déterminées par la méthode de microdilution en milieu liquide (NCCLS M7A5) pour l'ensemble des espèces bactériennes en plaque de polystyrène 96 puits.

Une colonie isolée de la bactérie *E. coli* ATCC 25922 ou *P. Aeruginosa* ATCC 27853 est mise en suspension dans 3 à 5ml de milieu de culture Mueller-Hinton (MH) et incubée à 37°C pendant une nuit sous agitation. A partir de cette culture de nuit, une culture en phase exponentielle de croissance de la souche est réalisée; le milieu MH est ensemencé au 1/50<sup>e</sup> avec la culture de nuit et incubé 2 heures à 37°C sous agitation. La concentration bactérienne est ajustée à 1x10<sup>6</sup> ufc/ml (Unités Formant Colonies) dans le milieu MH.

50 µl d'inoculum bactérien sont distribués par puits contenant un volume égal de la solution de conjugué diluée de demi en demi dans le milieu de culture adéquat (0 à 1

$\mu\text{M}$ ). Les cultures sont incubées à 37°C en air ambiant pendant 16 à 20 heures.

La CMI exprimée en  $\mu\text{M}$  est la première concentration ne présentant pas de croissance bactérienne.

5

## II – Résultats.

### II.1) Internalisation des conjugués DPV-Bodipy dans la bactérie Gram-négatif.

#### 10 II.1.a) Evaluation qualitative de l'internalisation des conjugués DPV-Bodipy.

##### - Evaluation qualitative dans la bactérie *E. coli*.

La figure 3 représente l'internalisation des conjugués DPV-Bodipy dans *E. coli*.

15 Les bactéries immobilisées sur lame de poly-L-Lysine sont incubées avec 1 $\mu\text{M}$  de conjugué DPV-Bodipy pendant 30 minutes à 37°C. Les images de microscopie (microscope optique à épifluorescence, objectif X 63 à immersion) montrent la pénétration du conjugué DPV-Bodipy dans les bactéries vivantes. A: DPV3, B: DPV3.10; C: DPV6; D: DPV7;  
20 E: DPV7b; F: DPV15; G: DPV15b; H: DPV1047; I: DPV11; J: DPV12; K: DPV1121; L: DPV19.

Les bactéries *E. coli* sont incubées 30 minutes à 37°C avec 1 $\mu\text{M}$  de conjugué DPV-Bodipy comme il est décrit dans le paragraphe I.8.a. L'internalisation des conjugués DPV-Bodipy  
25 fluorescents dans les bactéries non fixées est visualisée sous microscope à épifluorescence. Aucune fluorescence n'est détectée avec le conjugué contrôle Cys-Bodipy. Comme il est montré sur la figure 3, plusieurs conjugués DPV-Bodipy  
~~traversent les membranes bactériennes de la bactérie *E. coli*~~  
30 pour s'accumuler dans le cytoplasme bactérien. Les peptides DPV3.10 (Fig. 3B), DPV3 (Fig. 3A), DPV6 (Fig. 3C) et DPV15 (Fig. 3F) sont fortement pénétrant et internalisant de molécules hydrophobes. Avec les peptides DPV11 et DPV12 (Fig. 3I et 3J), nous obtenons des niveaux de fluorescence

hétérogènes dans une même population bactérienne. Les propriétés d'internalisation de ces peptides sont plus faibles. Le peptide DPV19 ne pénètre pas dans les bactéries.(Fig. 3L).

5           Un profil identique d'internalisation des conjugués DPV-Bodipy est observé après fixation des bactéries.

La figure 4 représente l'immuno-marquage de la membrane externe après internalisation du conjugué  
10 DPV3~bodipy.

Les bactéries *E. coli* immobilisées sur lame de poly-L-Lysine sont incubées avec 3 $\mu$ M du conjugué DPV3~Bodipy à 37°C pendant 30 minutes. Après internalisation, la membrane externe des bactéries vivantes est détectée par immuno-  
15 marquage en utilisant un anticorps monoclonal de souris anti-endotoxine et un anticorps polyclonal de lapin anti-Ig G de souris couplé au TRITC. La localisation du conjugué DPV3~Bodipy (fluorescence verte) et l'immuno-marquage de la membrane externe (fluorescence rouge) sont observés au  
20 microscope confocal. A : Taille originale de l'image ; B et D : Deux agrandissements de bactéries de l'image A.

Afin de confirmer la localisation des conjugués DPV~Bodipy dans le cytoplasme bactérien, les bactéries *E. coli* sont incubées avec 3 $\mu$ M du conjugué DPV3~Bodipy comme il  
25 est décrit dans le paragraphe III.8 et la membrane externe des bactéries vivantes est visualisée par immuno-marquage spécifique comme il est décrit dans le paragraphe III 9. L'endotoxine est un constituant spécifique de la membrane externe des bactéries Gram-négatif. La fluorescence des  
30 bactéries est visualisée au microscope confocal (Figure 4). L'internalisation du Bodipy est visualisée par une fluorescence verte et la membrane externe est identifiée par une fluorescence rouge. L'analyse de ces images montre clairement que le peptide DPV3 traverse les membranes

externe et interne de la bactérie Gram-négatif *E. coli* et permet l'accumulation du Bodipy dans le cytoplasme bactérien.

- Evaluation qualitative dans la bactérie *P. aeruginosa*.

La figure 5 représente l'internalisation des conjugués DPV-Bodipy dans *P. aeruginosa*.

Les bactéries immobilisées sur lame sont incubées avec 1 $\mu$ M de conjugué DPV-Bodipy pendant 30 minutes à 37°C. Les images de microscopie (microscope optique à épifluorescence, objectif X 63 à immersion) montrent la pénétration du conjugué DPV-Bodipy dans les bactéries vivantes. A: DPV3, B: DPV3.10; C: DPV6; D: DPV7; E: DPV7b; F: DPV15; G: DPV15b; H: DPV1047; I: DPV11; J: DPV12; K: DPV1121; L: DPV19.

La figure 6 donne des images de microscopie confocal de *P. aeruginosa*.

Les bactéries sont immobilisées sur lame de poly-L-Lysine et incubées avec 3 $\mu$ M de conjugué DPV3-Bodipy (A) ou de conjugué DPV7-Bodipy (B) à 37°C pendant 30 min puis fixées sur la lame. Les bactéries sont observées au microscope confocal. Un agrandissement de l'image originale des bactéries est présenté.

Une même évaluation qualitative est réalisée sur *P. aeruginosa*. La figure 5 montre l'internalisation des conjugués dans les bactéries après 30 minutes d'incubation. Les propriétés d'internalisation des DPV sont identiques à celles observées pour *E. coli* excepté pour les peptides DPV7b et DPV6 qui semblent être plus internalisants chez *P. aeruginosa*. L'observation au microscope confocal (Figure 6)

des bactéries incubées avec les peptides DPV3 ou DPV7b montre que ces peptides ont la capacité de traverser la membrane externe et permettre l'accumulation du Bodipy dans le cytoplasme bactérien.

II.1.b) Classification des DPVs.

Comme il est montré sur les figures 3 et 5, le niveau d'accumulation des conjugués DPV-Bodipy dans le cytoplasme bactérien est variable selon le DPV et selon la souche de bactérie. De façon générale, l'internalisation des DPV est

5 quasiment identique pour les deux souches de bactéries étudiées. Les peptides DPV peuvent être classés en trois groupes majeurs :

- DPV3, DPV3.10 : internalisation élevée
- DPV6, DPV7, DPV7b, DPV15 : internalisation moyenne

10 - DPV15b, DPV1047, DPV1121 : internalisation faible

Les peptides DPV3.10, DPV3, DPV6, DPV7 et DPV7b ont précédemment été décrits comme des peptides à localisation cytoplasmique dans les cellules eucaryotes (demande de

15 brevet internationale PCT publiée sous le No. WO 01/64738) quand ils sont couplés chimiquement à la protéine peroxydase ou à des IgG. A l'opposé, les peptides DPV15, DPV15b, DPV1047 et DPV1121 ont été décrits comme des peptides à localisation nucléaire. Il est important de noter que le

20 niveau d'internalisation des DPV « nucléaires » est plus faible que celui des DPV « cytoplasmiques ». Les peptides ayant un tropisme cytoplasmique sont les plus internalisants dans la bactérie.

Comme l'indique le tableau 1 ci-après, les peptides

25 DPV19, DPV11 et DPV12 n'ont pas de propriété d'internalisation dans la cellule eucaryote. La même propriété est observée avec les cellules procaryotes, comme les bactéries Gram-négatif.

30 Tableau 1 : Evaluation qualitative de l'internalisation des conjugués DPV-Bodipy dans la bactérie Gram-négatif

	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
DPV3~Bodipy	+++	+++
DPV3.10~Bodipy	++++	++++
DPV6~Bodipy	++	+++
DPV7~Bodipy	++	++
DPV7b~Bodipy	+	+++
DPV15~Bodipy	++	++
DPV15b~Bodipy	+	+
DPV1047~Bodipy	+	+
DPV1121~Bodipy	+	+
DPV19~Bodipy	-	-
DPV11~Bodipy	+/-	+/-
DPV12~Bodipy	-	-

#### II.1.c) Etude de l'effet de la poly-L-Lysine (support des bactéries) sur l'internalisation.

Afin de confirmer les résultats précédents et  
 5 d'évaluer une éventuelle interférence de la poly-L-Lysine  
 avec l'internalisation des conjugués, les bactéries *E. coli*  
 sont incubées avec les conjugués DPV-Bodipy pendant 30  
 minutes à 37°C puis lavées de façon extensive avec le tampon  
 NAPB avant d'être immobilisées et fixées ou non sur lame de  
 10 poly-L-Lysine. La localisation des conjugués est visualisée  
 au microscope optique à épifluorescence ou confocal. Les  
 propriétés d'internalisation des différents DPV ne diffèrent  
 pas des résultats obtenus précédemment. La Poly-L-Lysine n'a  
 pas d'effet sur la capacité du DPV à traverser les membranes  
 15 bactériennes et à pénétrer dans la bactérie.

#### II.1.d) Influence de la température sur le niveau d'internalisation.

Afin d'expliquer le mécanisme d'internalisation  
 précédemment observé, la capacité des DPV à internaliser à

+4°C a été analysée. Les bactéries *E. coli* en phase exponentielle de croissance sont immobilisées sur lame de poly-L-Lysine puis incubées pendant 24 heures à +4°C afin d'abolir le métabolisme énergétique de la bactérie. Les  
 5 bactéries sont ensuite incubées avec 3µM de DPV7-Bodipy ou Cyst-Bodipy (contrôle) pendant 30 minutes à +4°C comme il est décrit dans le paragraphe I.8.b) et lavées de manière extensive avant d'être visualisées au microscope optique à épifluorescence et confocal. Pour comparer les niveaux  
 10 d'internalisation à 37°C et à +4°C, la même expérience est conduite à 37°C comme il est décrit dans le paragraphe III.8.a.

Le niveau d'internalisation du DPV7 dans la bactérie est identique quelque soit la température de l'expérience.  
 15 Il semble donc que l'internalisation du conjugué DPV7-Bodipy dans *E. coli* n'est pas un mécanisme énergie-dépendant. Le phénomène est probablement une translocation passive au travers des membranes bactériennes.

## 20 II.2) Internalisation du conjugué DPV3-TMR dans *E. coli*.

Nous avons montré que certains peptides DPV peuvent traverser la membrane externe des bactéries Gram-négatif et pénétrer dans la bactérie pour internaliser un composé hydrophobe comme le Bodipy qui est normalement exclu par  
 25 cette membrane externe.

Afin de valider les résultats obtenus précédemment et exclure une quelconque influence du traceur fluorescent Bodipy sur l'internalisation, des expériences identiques ont été menées avec un deuxième traceur fluorescent hydrophobe,  
 30 le TMR. Le TMR diffère du Bodipy par des propriétés physico-chimiques comme sa structure ou la présence d'une charge positive (Fig. 2).

La figure 7 représente l'internalisation du conjugué DPV3-TMR dans *E. coli*.



Les bactéries *E. coli* sont immobilisées sur lame de poly-L-Lysine et incubées avec  $1\mu\text{M}$  du conjugué DPV3-TMR à  $37^\circ\text{C}$  pendant 30 min. Après internalisation, la membrane externe des bactéries vivantes est détectée par immuno-  
 5 marquage en utilisant un anticorps monoclonal de souris anti-endotoxine et un anticorps polyclonal de lapin anti-Ig G de souris couplé au FITC. La localisation du conjugué DPV3-TMR (fluorescence rouge) et l'immuno-marquage de la membrane externe (fluorescence verte) sont observés au  
 10 microscope confocal. A : Taille originale de l'image ; B et D : Deux agrandissements de bactéries de l'image A.

L'internalisation du conjugué DPV3 TMR est évaluée sur des bactéries *E. coli* immobilisées sur lame de poly-L-Lysine ou en suspension. Les bactéries sont incubées avec  $1\mu\text{M}$  de  
 15 conjugué DPV3-TMR ou le contrôle Cyst-TMR pendant 30 minutes à  $37^\circ\text{C}$ , puis fixées ou non sur lame avant d'être visualisées au microscope optique à épifluorescence. Quelque soit le protocole d'internalisation utilisé, aucune fluorescence n'est détectée avec le conjugué contrôle tandis que le DPV3-  
 20 TMR est visualisé par la fluorescence rouge de la bactérie.

Afin de confirmer l'internalisation du conjugué DPV3-TMR, les bactéries sont immobilisées sur lame de poly-L-Lysine et incubées avec  $1\mu\text{M}$  de conjugué à  $37^\circ\text{C}$  pendant 30 minutes. L'immuno-marquage de la membrane externe est  
 25 réalisé en utilisant l'anticorps monoclonal de souris anti-endotoxine et un anticorps polyclonal de lapin anti-IgG de souris couplé au FITC. La localisation du conjugué DPV3-TMR est observée au microscope confocal (Figure 7). Le conjugué  


---

 30 ~~DPV3-TMR traverse la membrane externe, pénètre dans la~~ bactérie et s'accumule dans le cytoplasme. Ce résultat est identique à ceux obtenus avec le traceur fluorescent Bodipy.

### II.3) Activité anti-bactérienne des conjugués DPV.

Afin de déterminer que l'internalisation des conjugués DPV n'induit pas la mort des bactéries, les 12 conjugués

DPV-Bodipy et le conjugué DPV3-TMR sont testés pour leur activité anti-bactérienne comme il est décrit dans le paragraphe I.10) Aucun des conjugués testés n'a montré une activité anti-bactérienne sur *E. coli* aux concentrations  
5 utilisés dans les expériences d'internalisation. Cette expérience montre que l'internalisation des conjugués n'affecte pas la viabilité bactérienne. Le mécanisme d'internalisation dans la bactérie n'est pas toxique.

# REVENDEICATIONS

1) Composition anti-bactérienne, plus particulièrement dirigée contre les bactéries gram négatif, comprenant  
5 l'association :

a) d'au moins un peptide de 10 à 25 résidus d'acide aminé comprenant :

i) deux domaines chargés positivement à pH neutre constitué de 3 à 9 résidus d'acide aminé dont les deux tiers  
10 au moins sont des acides aminés cationiques,

ii) entre lesdits domaines chargés positivement, un groupe de deux à trois résidus d'acide aminé non cationique,

iii) à l'une et ou l'autre des extrémités N ou C terminale du peptide, un groupe de 0 à 10 et de préférence  
15 de 0 à 5 résidus d'acide aminé choisis dans le groupe comprenant des acides aminés non hydrophobes et des acides aminés chargés positivement, mais dans le cas d'un résidu d'acide aminé chargé positivement celui-ci n'est pas directement adjacent aux domaines chargés positivement.

20 b) d'au moins un composé anti-bactérien.

2) Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce que (i) les acides aminés cationiques des deux domaines chargés positivement sont choisis dans le groupe  
25 comprenant l'arginine et la lysine, et en ce que (ii) les acides aminés non cationiques du groupe entre lesdits domaines chargés positivement sont des acides aminés non hydrophobes, choisis par exemple dans le groupe comprenant :  

---

l'acide glutamique, la serine, la glycine, la leucine, la  
30 glutamine.

3) Composition selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que le peptide est choisi dans le groupe comprenant les séquences suivantes : SEQ ID NO.1, SEQ ID

NO.2, SEQ ID NO.3, SEQ ID NO.4, SEQ ID NO.5, SEQ ID NO.6, SEQ ID NO.7, SEQ ID NO.8, SEQ ID NO.9, SEQ ID NO.11.

4) Composition selon l'une quelconque des  
5 revendications 1 à 3, caractérisée en ce que le peptide est  
choisi dans le groupe comprenant les séquences suivantes :  
SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.2, SEQ ID NO.3, SEQ ID NO.4, SEQ ID  
NO.5, SEQ ID NO.6, SEQ ID NO.7.

10 5) Composition selon l'une quelconque des  
revendications 1 à 3, caractérisée en ce que le composé  
anti-bactérien est choisi parmi ceux présentant des  
propriétés physico-chimiques le rendant incapables de  
traverser la membrane des bactéries gram négatif.

15 6) Composition selon l'une quelconque des  
revendications précédentes, caractérisée en ce que le  
composé anti-bactérien est hydrophobe.

20 7) Composition selon l'une quelconque des  
revendications précédentes, caractérisée en ce que le  
composé anti-bactérien est choisi dans le groupe comprenant  
les composés suivants : les antibiotiques de la famille de  
macrolides, des ketolides comme l'erythromycine, la  
25 clarithromycine, l'azithromycine, la télithromycine.

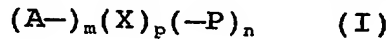
8) Composition selon l'une quelconque des  
revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle  
comprend l'association de peptide(s) et de composé(s) anti-  
30 bactérien(s) soit sous la forme d'un mélange, soit d'un  
produit dans lequel un ou plusieurs peptides identiques ou  
différents sont liées par covalence à un, ou plusieurs  
composés anti-bactériens identiques ou différents,  
éventuellement par l'intermédiaire d'un bras espaceur.

9) Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle comprend un produit de formule (I) suivante :



dans laquelle : A est le reste d'un composé anti-bactérien, P est le reste d'une peptide, tels que définis dans les revendications précédentes, et X représente soit une liaison covalente entre A et P, soit un bras espaceur  
10 reliant au moins un reste A à au moins un reste P, m est un nombre entier pouvant aller de 1 à 3, n est un nombre entier  
pouvant aller de 1 à 3, et p représente zéro ou un nombre entier au plus égal au plus grand des nombres m et n.

15 10) Un produit de formule (I) suivante :



comme défini dans la revendication 9.

11) Utilisation d'un peptide de formule (I) comme  
20 défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 4 pour la préparation d'une composition pharmaceutiques anti-bactérienne, plus particulièrement contre les bactéries gram négatif, dans laquelle ledit peptide est associé à au moins un composé anti-bactérien comme défini dans l'une des  
25 revendications 1 ou 5 à 7.

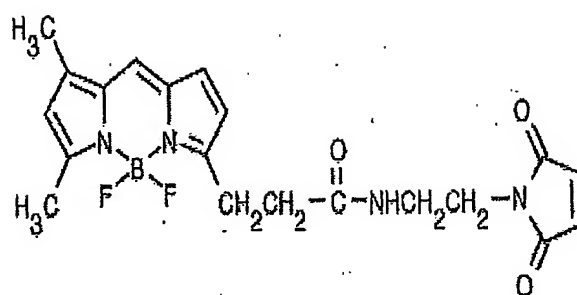


Figure 1

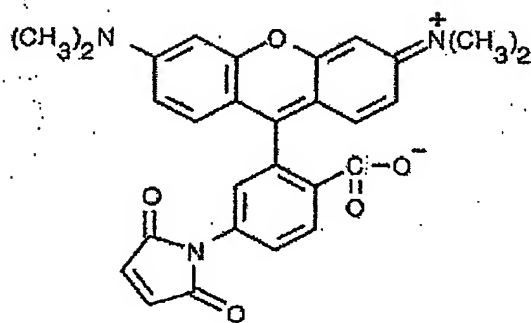


Figure 2

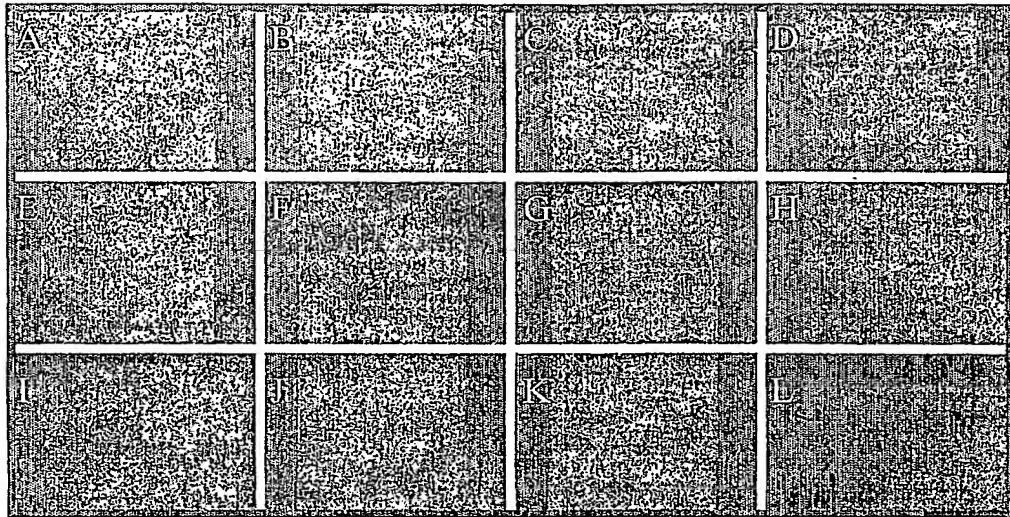


Figure 3

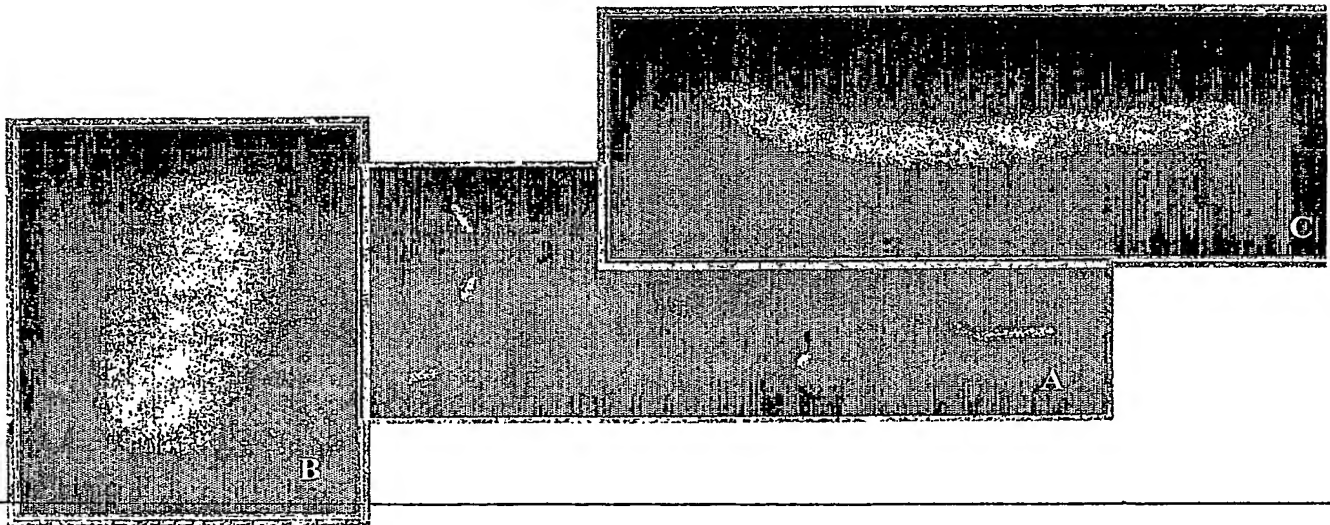


Figure 4

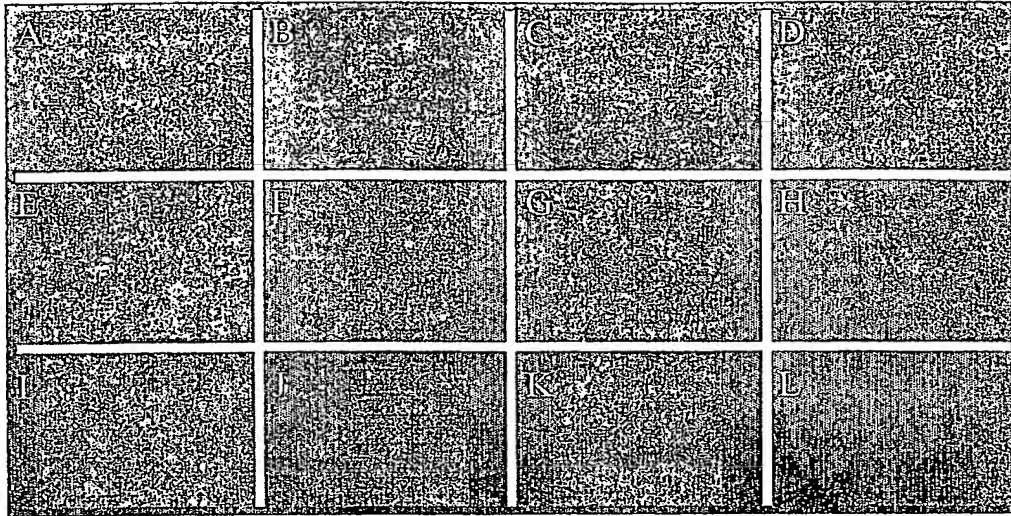


Figure 5

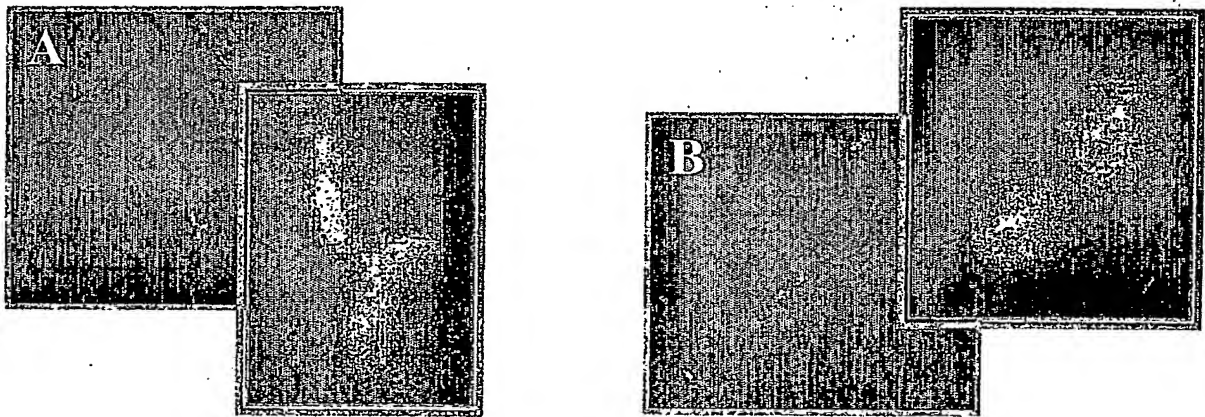


Figure 6



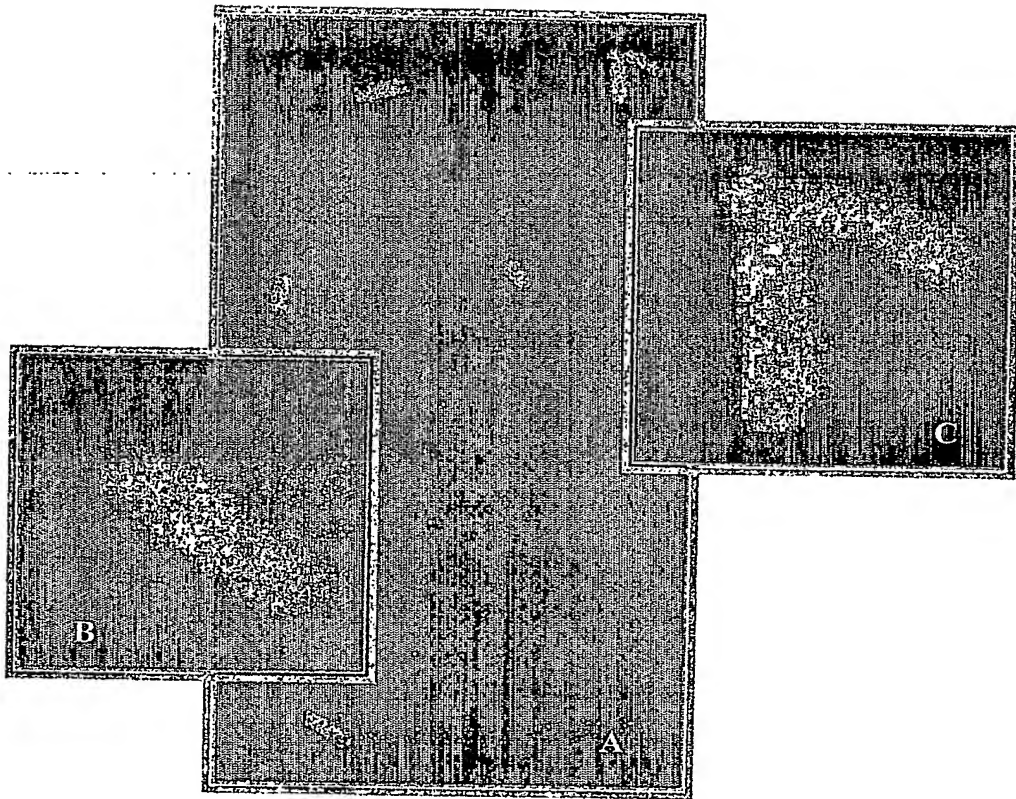


Figure 7

# LISTAGE DE SEQUENCES

<110> DIATOS S.A.

<120> COMPOSITION ANTI-BACTERIENNE, PLUS PARTICULIEREMENT CONTRE LES BACTERIES GRAM NEGATIF, COMPRENANT UN PEPTIDE ET UN AGENT ANTI-BACTERIEN AVANTAGEUSEMENT HYDROPHOBE

<130> 33356/FR

<160> 23

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Arg Lys Lys Arg Arg Arg Glu Ser Arg Lys Lys Arg Arg Arg Glu Ser  
1 5 10 15

<210> 2

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Arg Lys Lys Arg Arg Arg Glu Ser Arg Arg Ala Arg Arg Ser Pro Arg  
1 5 10 15

His Leu

<210> 3

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Gly Arg Pro Arg Glu Ser Gly Lys Lys Arg Lys Arg Lys Arg Leu Lys  
1 5 10 15

Pro

<210> 4

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Gly Lys Arg Lys Lys Lys Gly Lys Leu Gly Lys Lys Arg Asp Pro  
1 5 10 15

<210> 5

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Gly Lys Arg Lys Lys Lys Gly Lys Leu Gly Lys Lys Arg Pro Arg Ser  
1 5 10 15

Arg

<210> 6  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 6

Leu Arg Arg Glu Arg Gln Ser Arg Leu Arg Arg Glu Arg Gln Ser Arg  
1 5 10 15

<210> 7  
<211> 22  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 7

Gly Ala Tyr Asp Leu Arg Arg Arg Glu Arg Gln Ser Arg Leu Arg Arg  
1 5 10 15

Arg Glu Arg Gln Ser Arg  
20

---

<210> 8  
<211> 19  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 8

Val Lys Arg Gly Leu Lys Leu Arg His Val Arg Pro Arg Val Thr Arg  
1 5 10 15

Met Asp Val

<210> 9  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 9

Ala Lys Thr Gly Lys Arg Lys Arg Ser Gly  
1 5 10

<210> 10  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 10

---

Gln Gly Lys Ser Lys Arg Glu Lys Lys Asp Arg Val Phe  
1 5 10

<210> 11  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 11

Val Lys Arg Gly Leu Lys Leu Arg Gln Lys Tyr Asn Lys Arg Ala Met  
 1 5 10 15

Asp Tyr

<210> 12  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 12

Asn Pro Gly Val Ser Thr Val Val Leu Gly Ala Tyr Asp Leu Arg Arg  
 1 5 10 15

Arg Glu Arg Gln Ser Arg  
 20

<210> 13  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 13

Arg Lys Lys Arg Arg Arg  
 1 5

---

<210> 14  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 14

Arg Pro Arg  
 1

<210> 15  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 15

Lys Arg Lys Lys Lys Gly Lys  
 1 5

<210> 16  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 16

Arg Arg Glu Arg  
 1

<210> 17  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 17

Arg Arg Arg Glu Arg  
 1 5

<210> 18  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 18

Arg Arg Ala Arg Arg Ser Pro Arg  
1 5

<210> 19  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 19

Lys Lys Arg Lys Arg Lys Arg Leu Lys  
1 5

<210> 20  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 20

Lys Lys Arg  
1

<210> 21  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 21

Lys Lys Arg Pro Arg Ser Arg  
1 5

<210> 22  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 22

Arg Leu Arg Arg Glu Arg  
1 5

<210> 23  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 23

Arg Leu Arg Arg Arg Glu Arg  
1 5



<b>Vos références pour ce dossier (facultatif)</b>		33356/FR
<b>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL</b>		03/09962
<b>TITRE DE L'INVENTION</b> (200 caractères ou espaces maximum)		
COMPOSITION ANTI-BACTERIENNE, PLUS PARTICULIEREMENT CONTRE LES BACTERIES GRAM NEGATIF, COMPRENANT UN PEPTIDE ET UN AGENT ANTI-BACTERIEN AVANTAGEUSEMENT HYDROPHOBE		
<b>LE(S) DEMANDEUR(S) :</b>		
DIATOS 166 boulevard du Montparnasse 75014 PARIS France		
<b>DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :</b>		
<b>1</b>	Nom	ARRANZ
	Prénoms	Valérie
Adresse	Rue	34 rue Lafayette
	Code postal et ville	71711212 MONTHYON
Société d'appartenance (facultatif)		
<b>2</b>	Nom	
	Prénoms	
Adresse	Rue	
	Code postal et ville	
Société d'appartenance (facultatif)		
<b>3</b>	Nom	
	Prénoms	
Adresse	Rue	
	Code postal et ville	
Société d'appartenance (facultatif)		
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.		
<b>DATE ET SIGNATURE(S)</b> <b>DU (DES) DEMANDEUR(S)</b> <b>OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire) le 9 Août 2004 BREESE Pierre 921638		

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☒ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**